спектра, а также возрастанием микровязкости липидной фазы. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов максимально выражены в первые часы и сутки после введенния нитрита натрия и имеют стойкий характер.

Ключевые слова: *мембрана эритроцитов, гемическая гипоксия, микровязкость, липидный матрикс.*

Summary

FRACTIONAL COMPOSITION AND MICROVISCOSITY PROPERTIES OF THE LIPID MATRIX ERYTHROCYTE MEMBRANE OF MATURE AND OLD RATS IN HEMIC HYPOXIA

Jemela O.D.

The results of the study of fractional composition and microviscosity properties of the lipid matrix erythrocyte membrane of mature and old rats in hemic hypoxia. It is proved that sodium nitrite causes lipid bilayer erythrocyte membranes in animals of different age groups. Changes in the onedirection structure erythrocyte membrane in methemoglobinemia in mature and old rats have and show reduction of the absolute content of can all types of the lipids and phospholipids, disturbance lipid spectrum, as well as an increase in microviscosity of the lipid phase. Molecular disturbances of the red blood cells membrane of red blood cells are expressed in the first hours and days after the injection of sodium nitrite and remain without.

Key words: *the blood cells membrane, hemic hypoxia, microviscosity, lipid matrix.*

Впервые поступила в редакцию 12.05.2013 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования

УДК: 616.718+616-005.4+616-008.6-08:615.3:616-092.4

СОЧЕТАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АНАЛОГОВ ЕСТЕСТВЕННОГО ПРОСТАГЛАНДИНА Е1, ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕОЛИЗА И АНТИОКСИДАНТОВ ДЛЯ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РЕПЕРФУЗИОННОГО СИНДРОМА

Федосов М.И., Мальченко О.А., Кубышкин А.В., Бабанин А.А., Пылаева Н.Ю.

ГУ "Крымский государственный медицинский университет имени С.И.Георгиевского», г. Симферополь

Развитие реперфузионного синдрома сопровождается усилением протеолитической активности, угнетением активности ингибиторов протеиназ, повышением уровня основных провоспалительных цитокинов сыворотки крови, максимально выраженными через 12 часов после реперфузии. Сочетанное применение аналогов естественного простагландина Е1, ингибиторов протеолиза и антиоксидантов для медикаментозной коррекции экспериментального реперфузионного синдрома сопровождается более выраженным суммарным снижением протеолитической активности, увеличением активности ингибиторов протеиназ, снижением концентрации основных провоспалительных цитокинов сыворотки крови в сравнении с эффектами от применения только ингибиторов протеолиза и антиоксидантов.

Ключевые слова: ишемия, реперфузия, протеиназы, цитокины, ингибиторы протеолиза, антиоксиданты, простагландин Е1.

Введение

Реперфузионный синдром, развивающийся в результате восстановления кровотока в ранее ишемизированной ткани, является широко распространённым явлением и довольно часто встречается

при авариях на транспорте и в практике медицины неотложных состояний. В патогенезе реперфузионного синдрома всё больше значения придаётся чрезмерной активации и выбросу в системный кровоток большого количества биологически активных веществ, а его развитие рассматривается с позиции формирования синдрома системной воспалительной реакции (ССВР) [1,2,3]. Причём отмечено, что развитие ССВР сопровождается чрезмерной системной активацией цитокинов, протеолитических ферментов и свободнорадикального окисления, которые наряду с компонентами других биологически активных систем приводят к нарушениям гемокоагуляции, эндотелиальной дисфункции, развитию ДВС-синдрома [3, 4,5, 6, 7, 8].

Учитывая патогенетические механизмы формирования ССВР и реперфузионного синдрома, в настоящее время всё большее значение придаётся изучению влияния простагландинов и их синтетических аналогов для коррекции этих состояний. Известно, что простагландин Е1 (ПГЕ1) обладает вазодилатирующими и эндотелий-стабилизирующими свойствами, является эффективным ингибитором агрегации тромбоцитов, ингибирует активацию нейтрофилов, снижая высвобождение свободных радикалов, лизосомальных ферментов, медиаторов хемотаксиса, цитокинов [9, 10, 11]. Следует предположить, что включение его в лечебный комплекс наряду с использованием ингибиторов протеолиза и антиоксидантов расширит спектр воздействия на основные звенья патогенеза синдрома ишемии-реперфузии и позволит повысить эффективность лечения и выживаемость пациентов при критических состояниях.

Целью настоящей работы явилось изучение эффективности медикаментозной коррекции экспериментального синдрома ишемии-реперфузии с использованием аналогов естественного ПГЕ1, ингибиторов протеолиза и антиоксидантов.

Объекты, контингенты, методы исследования

Экспериментальные исследования проведены на 70 белых крысах-самцах линии “Вистар” массой 180-210 г. Содержание животных в виварии было одинаковым, что является условием создания структурной группы и соответствовало требованиям биоэтики, предъявляемым к уходу и использованию лабораторных животных [12].

Синдром ишемии-реперфузии моделировали путём наложения резиновых жгутов на обе задние конечности на уровне паховой складки сроком на 6 часов. Ширина пережатия тканей составила 2-3 мм. Показателем правильности наложения жгута являлось отсутствие отёка конечностей и бледность их окраски. Реваскуляризация производилась одномоментно путём рассечения жгутов через 6 часов после их наложения. Учитывая, что через 12 часов после развития синдрома ишемии-реперфузии в сыворотке крови экспериментальных животных наблюдаются наиболее выраженные изменения, именно это срок был выбран для дальнейшего изучения в условиях медикаментозной коррекции [13].

Лечение экспериментальных животных осуществляли посерийно: первая группа получала лечение с применением ингибиторов протеолиза (препарат «Гордокс» («Гедеон Рихтер», Венгрия) в дозе 20000 ЕД/кг массы тела), вторая группа – с применением антиоксидантов (препарат «Корвитин» (Борщаговский ХФЗ, Украина) в дозе 10 мг/кг массы тела), третья группа — при помощи комбинации ингибиторов протеолиза и антиоксидантов (в тех же дозировках) и четвёртая группа – с применением комбинации ингибиторов протеолиза, антиоксидантов и аналогов естественного простагландина Е1 (препарат «Алпростан» («Zentiva», Чехия) в дозе 20 мкг/кг массы тела). Всем экспериментальным животным, получавшим лечение, препараты вводились инъекционным способом интраперитонеально однократно, за 30 минут до реваску-

ляризации конечностей.

Эвтаназия животных осуществлялась под тиопенталовым наркозом путём декапитации через 12 часов после реперфузии. Кровь для исследования получали через 12 часов после реперфузии (n = 12), через 12 часов после реперфузии на фоне лечения перечисленными препаратами в четырёх экспериментальных группах (n = 12 в каждой). В качестве контроля служила группа интактных животных (n = 10).

Определение активности компонентов протеиназ-ингибиторной системы проводили с использованием энзиматических методов [14]. Трипсиноподобную активность (ТПА) определяли по скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина (БА) от синтетического субстрата этилового эфира N-±-бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) (Sigma). Определение эластазоподобной активности (ЭПА) проводили на основании изучения скорости гидролиза синтетического субстрата N-t-вос-аланил-n-нитрофенилового эфира (БАНФЭ). Определение концентрации альфа-1-ингибитора протеиназ (АТА) проводили на основании торможения расщепления трипсином этилового эфира N-±-бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) (Sigma). Определение активности кислотостабильных ингибиторов (КСИ) осуществлялось тем же методом после предварительной подготовки сыворотки прогреванием в кислой среде.

Определение концентрации основных провоспалительных цитокинов (IL-1Я, IL-6 и TNF-±) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов «RayBio» (США). Результаты фиксировали с помощью микропланшетного сканера с длиной волны 450 нм.

Статистическая обработка полученных данных проведена с применением методов вариационной статистики с вычислением средних величин (M), оценкой вероятности расхождений (m) и оценкой достоверности изменений с использованием t-критерия Стьюдента. За достоверную принималась разность средних значений при $p < 0{,}05$ [15].

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты показали, что через 12 часов после развития реперфузионного синдрома в сыворотке крови экспериментальных животных, не получавших лечение, наблюдались выраженные изменения: минимальное значение показателя ЭПА, составившее 19 % от контрольного значения, повышение значения ТПА на 64 % относительно контроля, снижение АТА на 25,7 % и активности КСИ на 50 % в сравнении с контрольным значением.

При медикаментозной коррекции экспериментального реперфузионного синдрома в сроке 12 часов наблюдается примерно равнозначное увеличение ЭПА в сравнении с нелеченной группой, хотя во всех группах его значение остаётся в 2 раза ниже значения в группе контрольных животных (рис.1). В то же время, значение ТПА на фоне лечения достоверно снизилось, причём максимальное его снижение, в 3,5 раза, наблюдалось в группе, получавшей лечение ингибитором протеолиза и антиоксидантом. АТА достигла максимального уровня, при этом став в 1,5 раза выше значения в нелеченной группе, при применении ингибиторов протеолиза, антиоксидантов и аналогов естественного ПГЕ1. Максимально высокие значения КСИ, в 2 раза выше по сравнению с нелеченной группой, выявлены при применении комбинации «Гордокса» и «Корвитина», а также при добавлении в лечебный комплекс «Алпростана».

Наиболее эффективное снижение концентрации IL-1I, в 10 раз, наблюдалось в случае использования комбинации ингибиторов протеолиза и антиоксидантов (рис. 2). Максимальное снижение концентрации IL-6, почти в 4,5 раза ниже значения в нелеченной группе, отмечено при лечении экспериментальных животных ингибитором протеолиза. Уровень

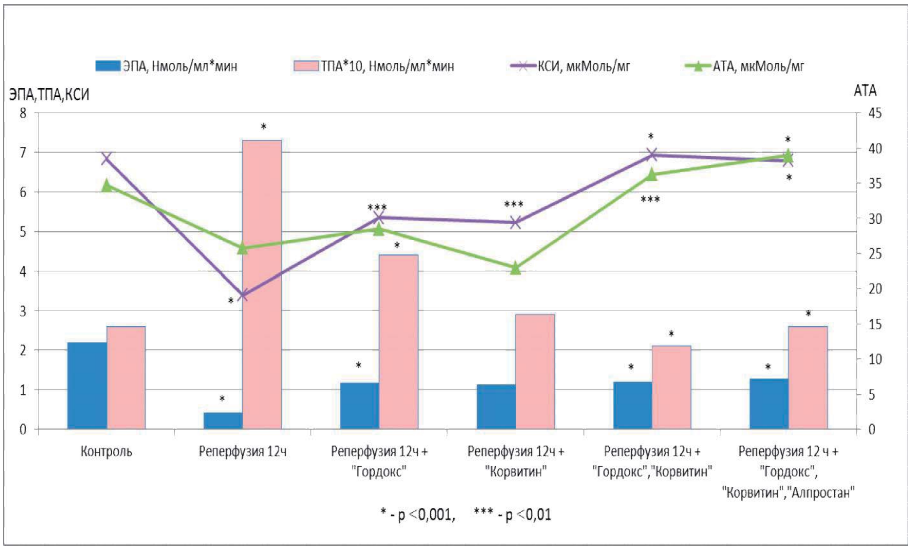

Рис. 1. Изменения в протеиназ-ингибиторной системе крови крыс при развитии реперфузионного синдрома на фоне лечения.

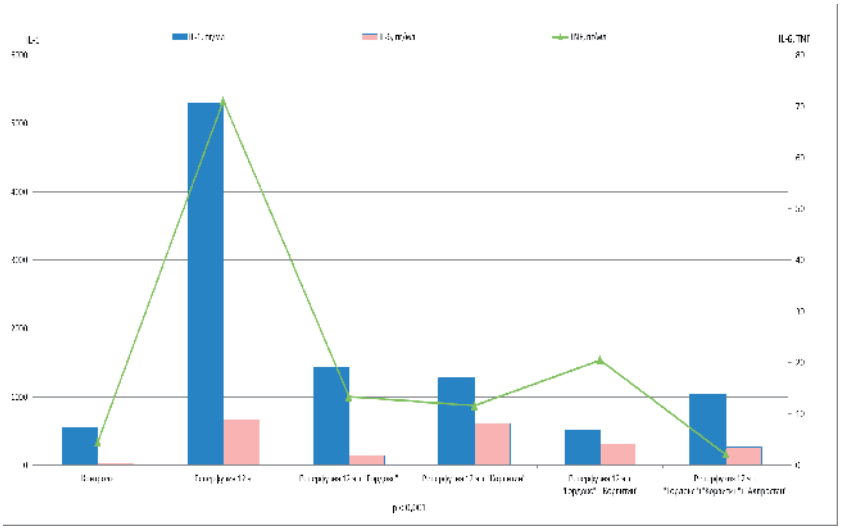

Рис. 2. Изменения системе цитокинов крови крыс при развитии синдрома ишемии-реперфузии на фоне лечения.

протеолиза «Гордокс» способствует снижению суммарной протеолитической активности, блокирует активацию калликреин-кининовой системы, ингибирует продукцию тканевого тромбопластина, оказывает антифибринолитический и гемостатический эффекты. Антиоксидант «Корвитин», оказывая антиоксидантное воздействие, снижает выработку цитотоксического супероксид-аниона, в комплексе с ингибиторами протеолиза препятствует их окислению и способствует сохранению антипротеолитической активности, оказывает ингибирующее влияние на мембранотропные ферменты, участвующие в деградации фосфолипидов клеточных мембран (фосфолипазы, фосфогеназы, циклооксигеназы), что сказывается на торможении синтеза лейкотриенов. При этом, использование водорастворимой формы способствует более быстрому достижению желаемого эффекта. Добавление в лечебный комплекс аналога естественного ПГЕ1 («Алпростан») приводит к проявлению его вазодилатирующего и эндотелий-стабилизирующего эффектов, эффективному ингибированию агрегации тромбоцитов и эритроцитов, тормозит активацию нейтрофилов, что проявляется снижением высвобождения

TNF-± максимально снизился, более, чем в 30 раз, при применении комбинации из трёх указанных препаратов. Достоверность отличий по отношению к контролю для всех значений $p < 0,001$.

Таким образом, при экспериментальной медикаментозной коррекции реперфузионного синдрома осуществлялось воздействие на различные звенья патогенеза данного критического состояния соответственно механизмам действия применённых препаратов. Так, использование поливалентного ингибитора

свободных радикалов, лизосомальных ферментов, медиаторов хемотаксиса; эффективно снижает концентрацию TNF-±. В результате комплексного патогенетического медикаментозного воздействия получен наиболее выраженный положительный эффект, обеспечивающий одновременное воздействие на несколько звеньев патогенеза синдрома ишемии-реперфузии, и приводящий к снижению активности протеолитических ферментов, повышению активности их ингибиторов и снижению концентрации основных провоспалительных цитокинов.

Выводы

1. Развитие реперфузионного синдрома сопровождается усилением протеолитической активности сыворотки крови, угнетением антипротеолитической активности, повышением уровня основных провоспалительных цитокинов в сыворотке крови, что даёт возможность расценивать эти показатели в качестве маркеров развития ССВР.
2. Экспериментальная медикаментозная коррекция реперфузионного синдрома с использованием комбинации ингибиторов протеолиза и антиоксидантов приводит к снижению протеолитической активности, повышению антипротеолитической активности, снижению концентрации основных провоспалительных цитокинов в сыворотке крови.
3. Максимальный лечебный эффект при медикаментозной коррекции экспериментального синдрома ишемии-реперфузии достигается при сочетанном применении ингибиторов протеолиза, антиоксидантов и аналогов естественного простагландина Е1, что объясняется потенцированием их эффектов и одновременным воздействием на несколько основных звеньев патогенеза.

Литература

1. Черешнев В.А. Системное воспаление как иммунопатобиологический феномен. / Черешнев В.А. Гусев Е.Ю. – С.-Пб.: Цитокины и воспаление 2002; Т.1(2): 17-22.
2. Метаболические и тканевые соотношения во время реперфузионного синдрома / Таций Ю.П., Вардосанидзе С.Л., Вырвыхвост А.В. и др. // — М.: Ангиология и сосудистая хирургия. – 2001. – Т. 7, №4. – С. 44-50.
3. Кашталап В.В. Влияние системной тромболитической терапии альтеплазой и стрептокиназой на показатели функции эндотелия и прогноз пациентов с инфарктом миокарда с подъёмом ST. / Кашталап В.В., Барбараш О.Л., Воронова Н.Л. – Н.: Бюлл. СО РАМН. – 2006. — №4 (126). – С. 132-137.
4. Knight S. Renal functional responses to ischaemia-reperfusion injury in normotensive and hypertensive rats following non-selective and selective cyclo-oxygenase inhibition with nitric oxide donation / S.Knight, E.J., Johns / / Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2008. — Vol. 35, № 1. – P. 11-16.
5. Rossi A. The role of 5-lipoxygenase and leukotrienes in shock and ischemia-reperfusion injury / A. Rossi, C. Pergola, S. Cuzzocrea et al. // Scientific World Journal. – 2007. — № 7. – P. 56-74.
6. Douvas S. Anti-Inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor / S. Douvas, A. Kolokotronis, P. Stefanopoulos // Infection and Immunity. – 2005. – Vol. 73, №. 3. – P. 1271-1274.
7. Hayama T. Benefical effect of neutrophil elastase inhibitor on renal warm ischemia-reperfusion injury in the rat / T. Hayama, M. Matsuyama, K. Funao / / Transplant Proc. – 2006. – Vol. 38, № 7:2201-2203.
8. Marshall J.C. Immune response in the critically Ill / J.C. Marshall, J. Coehn. — Softcover ed. Germany (Berlin Hiedelberg): Springer-Verlag, 2002.
9. Jiang YF. Effects of alprostadil and

ulinastatin on inflammatory response and lung injury after cardiopulmonary bypass in pediatric patients with congenital heart diseases / Jiang YF, Wang WW, Ye WL, Ni YF, Li J, Chen XL, Jin SW, Lian QQ // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. — 2008;88(41):2893-7.

10. Lindemann S. Prostacyclin inhibits adhesion of polymorphonuclear leukocytes to human vascular endothelial cells due to adhesion molecule independent regulatory mechanisms. / Lindemann S, Gierer C, Darius H. — Basic Res Cardiol. — 2003;98(1):8-15.
11. Blogowski W. The effect of PGE administration on the activity of oxidative system in erythrocytes and platelets during ischemia reperfusion injury and on postoperative renal function in patients undergoing open abdominal aortic aneurysm reconstruction. / Blogowski W, Dolegowska B, Pikula E, Gutowski P, Starzynska T. // J Biol Regul Homeost Agents. — 2012 Jul-Sep;26(3):429-38.
12. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. // Official Journal of the European Union, L. 276: 33-79.
13. Федосов М.И. Патогенетическое значение цитокиновых и протеолитических механизмов при реперфузионном синдроме. / Федосов М.И., Фомочкина И.И., Кубышкин А.В., Бабанин А.А., Пылаева Н.Ю. // *Таврический медико-биологический вестник.* 2012; Т. 15, №3, ч.1: 354-357.
14. Кубышкин А.В. Методы определения активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови и биологических жидкостях. / Кубышкин А.В., Харченко В.З., Семенец П.Ф., Алиев Л.Л., Фомочкина И.И., Анисимова Л.В. // Киев, 2010.
15. А. Петри. Наглядная статистика в медицине. / А. Петри, К. Сэбин // М.:ГЭОТАР МЕД, 2003.

Резюме

ПОЄДНАНЕ ЗАСТОСУВАННЯ АНАЛОГІВ ПРИРОДНЬОГО ПРОСТАГЛАНДИНУ Е1, ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕОЛІЗУ ТА АНТИОКСИДАНТІВ ДЛЯ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ КОРЕКЦІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РЕПЕРФУЗІЙНОГО СИНДРОМУ

Федосов М.І., Мальченко О.А., Кубишкін А.В., Бабанін А.А., Пилаєва Н.Ю.

Розвиток реперфузійного синдрому супроводжується підсиленням протеолітичної активності, пригніченням активності інгібіторів протеїназ, підвищенням рівня основних прозапальних цитокінів сироватки крові, що є максимально вираженим через 12 годин після реперфузії. Поєднане застосування аналогів природнього простагландину Е1, інгібіторів протеолізу та антиоксидантів для медикаментозної корекції експериментального реперфузійного синдрому супроводжується більш вираженим сумарним зниженням протеолітичної активності, підвищенням активності інгібіторів протеїназ, зниженням концентрації основних прозапальних цитокінів у сироватці крові в порівнянні з ефектами від застосування тільки інгібіторів протеолізу та антиоксидантів.

Ключові слова: ішемія, реперфузія, протеїнази, цитокіни, інгібітори протеолізу, антиоксиданти, простагландин Е1.

Summary

COMBINED USE OF NATURAL PROSTAGLANDIN E1 ANALOGUES, PROTEOLYTIC INHIBITORS AND ANTIOXIDANTS FOR MEDICAL CORRECTION OF EXPERIMENTAL REPERFUSION SYNDROME

Fedosov M.I., Malchenko O.A., Kubyshkin A.V., Babanin A.A., Pylaeva N.Yu.

Development of reperfusion syndrome is accompanied by increased proteolytic activity, inhibition of the activity of protease inhibitors, the rise of the major

proinflammatory cytokines serum with the maximum expression at 12 hours after reperfusion. Combined use of natural analogues of prostaglandin E1, proteolysis inhibitors and antioxidants for medical correction of experimental reperfusion syndrome is accompanied by a more pronounced decrease in the total proteolytic activity, an increase in activity of proteinase inhibitors, reduced concentrations of key pro-inflammatory cytokines in the serum compared with the effects of the use of only proteolysis inhibitors and antioxidants.

Keywords: ischemia, reperfusion, proteinase, cytokines, proteolysis inhibitors, antioxidants, prostaglandin E1.

Впервые поступила в редакцию 12.05.2013 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования

УДК 615.5-02:616-008.61-07

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ И ДИСБИОЗА В КОЖЕ КРЫС С ИММУНОДЕФИЦИТОМ, КИШЕЧНЫМ ДИСБИОЗОМ И ДЕЙСТВИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

Шухтин В.В.[1], Гоженко А.И.[1], Левицкий А.П.[2], Шухтина И.Н.[3]

[1]Украинский НИИ медицины транспорта (г. Одесса)

[2]ГУ "Институт стоматологии НАМН" (г. Одесса)

[3]Одесский национальный медицинский университет(г. Одесса)

Исследовали в коже крыс состояние воспаления (по уровню эластазы и малонового диальдегида), степень дисбиоза (по соотношению относительных активностей уреазы и лизоцима), уровень антиоксидантной защиты (по активности каталазы и антиоксидантно-прооксидантному индексу АПИ), а также содержание гиалуроновой кислоты. Моделировали иммунодефицит (ИД) с помощью циклофосфана, кишечный дисбиоз – с помощью линкомицина и эндотоксикоз – с помощью липополисахарида (ЛПС).

Установлено, что при всех трех воздействиях наблюдается развитие в коже дисбиоза и воспаления, обусловленное, по-видимому, снижением содержания гиалуроновой кислоты и ослаблением антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: кожа, иммунодефицит, дисбиоз, липополисахарид, воспаление, антиоксидантная система.

Нами ранее было показано, что при экспериментальном иммунодефиците (ИД), вызываемом с помощью цитостатика циклофосфана, в коже развивается воспаление и дисбиоз [1].

Известно, что причиной дисбиоза чаще всего является ИД [2, 3]. Известно также, что реализация патогенного действия на организм дисбиоза (прежде всего, кишечного) осуществляется, главным образом, за счет липополисахарида (ЛПС) – кишечного эндотоксина, образуемого Грам-отрицательными условно-патогенными и патогенными бактериями [4, 5].

Целью настоящего исследования стало сравнительное изучение патогенного действия на кожу крыс трех видов воздействия: иммунодефицита, кишечного дисбиоза и липополисахарида. Патогенное действие этих трех факторов оценивали по уровню биохимических маркеров воспаления (эластаза, малоновый диальдегид) и дисбиоза (уреаза, лизоцим, степень дисбиоза по Левицкому).

Материалы и методы исследования

Эксперименты были проведены на 24 белых крысах линии Вистар (самцы, 10